ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ

УДК: 619:616.98:587

С.С. Абакин, С.В. Криворучко, Д.Г. Пономаренко, Е.А. Борщев
(ГНУ Ставропольский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства Россельхозакадемии (г. Ставрополь))

СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА ОСОБЕННОСТИ ПРИЖИЗНЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ И ИММУНОГЕНЕЗ У ТЕЛЯТ В СИСТЕМЕ МАТЬ-ПОТОМСТВО, ПРИ ЛЕЙКОЗЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Ключевые слова: лейкоз, телята, иммуноферментный анализ, реакция иммунодифузии, полимеразная цепная реакция, иммунодефицит, инфицированный, Т-, В-лимфоцит.

На протяжении многих миллионов лет существования жизни на земле природа создала сложную, но надежную систему, получившую название иммунной, или иммунокомпетентной. Основной задачей этой системы является создание условий для того, чтобы конкретный организм, конкретный индивидуум не погибал. Это значит, что под влиянием иммунной системы находится функционирование многих органов и систем организма. Однако, прежде всего, важно, чтобы организм не погибал от инфекционных заболеваний, которые развиваются под влиянием экзогенных инфекционных возбудителей, либо тех, которые населяют организм и относятся, к так называемым сапрофитам [4].

Лейкоз крупного рогатого скота относится к числу наиболее распространенных хронических инфекционных болезней сельскохозяйственных животных во многих странах мира, включая Россию. За последние 15 лет в Российской Федерации уровень инфицированности ВЛКРС практически не изменился и находится в переделах 10,3-14,7%, а доля лейкоза структуре инфекционной патологии КРС составляет более 50% [1,3,9,11,12].

Ряд исследователей в области лейкозологии утверждают, что на фоне бесспорной породной предрасположенности, одной из основных причин инфицирования животных вирусом лейкоза (далее- ВЛ) является низкий иммунный статус [1,2,14,15,3,8,10,15]

В настоящее время основными принципами эффективной борьбы с лейкозом крупного рогатого скота является профилактика, при этом основной подход к предупредительным мероприятиям складывается из последовательной ротации инфицированного поголовья «чистыми» от ВЛ животными. Однако в связи с резким ухудшением материальной базы большинства хозяйств РФ, подобные методы борьбы с лейкозом КРС практически невозможны.

Нельзя забывать, что вертикальный путь передачи вирусной инфекции не является ведущим в эпизоотическом процессе лейкоза (3-5%), так давно известно, что от инфицированной коровы хозяйство чаще получает «чистого» от ВЛ теленка. При этом инфицирование молодняка происходит, как правило, после рождения.

Анализ выше изложенного наталкивает на вопрос, каким образом и какими мероприятиями, возможно, снизить риск инфицирования молодняка.

В связи с этим, проблемы иммуногенеза, и в целом иммунного статуса у телят, как инфицированных ВЛ, так и восприимчивых к вирусу, являются актуальными, а исследования в этой области помогут решить ряд фундаментальных задач.

Исходя из этого, целью настоящих исследований, явилось – изучение особен-

ностей диагностики и иммуногенез телят в системе мать-потомство, при лейкозе крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследований

Для реализации поставленной задачи в стационарно неблагополучном, по лейкозу хозяйствах СПК «Новомарьевское» и СПК АФ «Восточное» Ставропольского края (инфицированность поголовья более 50%) была сформирована экспериментальная группа из 36-ти глубокостельных коров (8-8,5 месяцев стельности) в возрасте 4-5 лет. Все коровы положительно реагировали по РИД и ИФА. В дальнейшем от этих животных было получено 32 теленка (у 3-х коров плоды мертворожденные, одна корова выбракована по причине не связанной с заболеванием). Исследования проведены в 2008-2009гг.

У новорожденных телят (n=32), до приема молозива, была взята кровь для проведения комплексной диагностики на инфицированность вирусом лейкоза в РИД, ИФА и ПЦР. Так же, пробы крови обирали в возрасте одного и трех месяцев.

Для проведения реакции иммунодиффузии в агаровом геле использовали наборы ФГУП «Курская биофабрика – фирма “Биок”», учет реакции через 48 часов (визуальный). Постановку иммуноферментного анализа проводили тест-системой ИФА производство НПО «Нарвак», учет с использованием анализатора иммуноферментных реакций АИФР-01 Униплан [5,12]. Полимеразную цепную реакцию ставили наборами “GenePak” для обнаружения ДНК возбудителей лейкоза КРС (ООО «Лаборатория Изоген») [6,7].

Общее количество лейкоцитов определяли общепринятым методом [2], уровень циркулирующих (растворимых) иммунных комплексов в сыворотке крови выявляли по П. Фальку, популяции Т- и В-лимфоцитов в крови телят, определяли методом розеткаобразования с эритроцитами мыши [5].

Результаты исследований

При комплексном обследовании этих животных установлено, что 15 коров (41,6%) дали положительную реакцию в ПЦР. Гематологическими исследованиями патологических изменений картины крови не выявлено [2].

Сравнительный анализ данных в системе мать-потомство показал, что из 32-х телят 5 (15,6%) положительно прореагировали по ПЦР. Из них двое (40%) положительно реагировали в РИД и ИФА. Все ПЦР- положительные телята получены от инфицированных матерей.

При этом 27 (84,4%) телят, полученных как от инфицированных, так и от не инфицированных матерей, дали отрицательный результат по всем реакциям.

Телята, носители провирусной ВЛ ДНК (5 телят), содержались раздельно от остальных животных, последние находились в общем стаде, при этом всех животных выпаивали сборным, не пастеризованным молоком (согласно схеме используемой в хозяйстве).

По результатам второго и третьего исследований – в возрасте одного и трех месяцев – были выявлены новые инфицированные животные.

В РИД и ИФА в возрасте 1 месяц положительно реагировали 23 (71,8%) теленка. По ПЦР прореагировали 6 (18,7%) телят (5 телят инфицированные внутриутробно + 1 теленок); полученных от инфицированных матерей. Остальные 9 (28,2%) животных от инфицированных и не инфицированных матерей дали отрицательную реакцию.

В 3 месяца по РИД и ИФА положительно прореагировало 25 (78,1%) телят. В ПЦР – выявлен еще один теленок (всего к 3 мес. – 7 животных).

Можно предположить, что такое количество РИД и ИФА-позитивных животных (25 телят – 78,1%) вызвано выпойкой смешанного молока, содержавшего антитела к ВЛ и вероятно вирус лейкоза, а так же совместное содержание здоровых и инфицированных животных.

Так, из 32 телят, 5 животных были инфицированы во время эмбриогенеза и 2-е животных в постэмбриональный период.

Таблица 1

Динамика выявления инфицированности телят в тест-системах РИД, ИФА и ПЦР

Период исследования	Кол-во позитивных в РИД и ИФА телят/%	Кол-во позитивных в ПЦР телят/%
Новорожденные, n=32 (до выпойки молозива)	2/**6,2**	5/**15,6**
В возрасте 1 месяц, n=32	23/**71,8**	6/**18,7**
В возрасте 3 месяца, n=32	25/**78,1**	7/**21,9**

В тоже время, необходимо отметить, что 7 (21,9%) телят во все периоды исследования давали отрицательные результаты по всем реакциям.

Ввиду того, что вероятность проникновения вируса лейкоза в организм плода или новорожденного зависит от многих факторов, особенно от состояния иммунной системы организма, нами были изучены, в динамике, некоторые показатели клеточного и гуморального звена иммунитета инфицированных и клинически здоровых телят. С целью снижения субъективности результатов, кровь была взята только у ПЦР-положительных и ПЦР-отрицательных телят, так как, антителоносительство у животных способствует модуляции иммунного статуса, даже при исключении инфицированности ВЛ (табл. 2).

Анализируя полученные результаты необходимо отметить, что у инфицированных внутриутробно новорожденных телят, наблюдается увеличение уровня циркулирующих иммунных комплексов на 27,5%, выявлено снижение общего количества лейкоцитов, уровень Т- и В- лимфоцитов в крови, так же имели достоверно низкие показатели.

В возрасте 1 месяц, у инфицированных ВЛ телят, установлено снижение числа лейкоцитов на 25,3% и популяции Т-лимфоцитов в среднем на 6,4 абс.%. Уровень ЦИК, в группе ПЦР-положительных телят, превышал аналогичных показатель у ПЦР-отрицательных животных, но в связи с высокими колебаниями по группе разнился недостоверно, аналогичная тенденция выявлена и относительно популяции В-клеток.

Анализом иммунологических показателей крови инфицированных ВЛ телят установлено повышение уровня циркулирующих иммунных комплексов на 12%, количество Т-лимфоцитов было снижено в сравнении с ПЦР-отрицательными телятами в среднем на 5,3 абс.%.

Выводы

Анализ результатов проведенных исследований позволяет сделать следующие заключения:

– диагностику инфицированности вирусом лейкоза у глубокостельных коров необходимо производить с применением ПЦР, так как серологические методы в 58% случаев субъективны. Данное мы связываем с определенной иммунологической напряженностью беременного организма, в связи с этим, стельные животные зачастую дают неспецифическую положительную реакцию в РИД и ИФА. Однако и выявление инфицированных ВЛ животных в ПЦР имеет ряд недостатков, основные из которых это отсутствие универсальных праймеров и слабая чувствительность теста при низком титре вируса, что обусловлено непрерывной модификацией (модуляцией) возбудителей и особенностью репликации ВЛ in vivo;

– при выявлении степени вертикальной передачи ВЛ установлено, что в стационарно неблагополучном по лейкозу хозяйстве процент внутриутробной передачи вируса лейкоза может увеличиться до 15% и более, при этом у 40% пренатально инфицированных телят выявляются антитела в сыворотке крови, что апеллирует в поль-

Таблица 2.

Динамика иммунологических показателей инфицированных и не инфицированных ВЛ телят

Телята, реакция в ПЦР	ЦИК,ед	Лейкоциты, х10^9/л	Т-лимфоциты,%	В-лимфоциты,%
Новорожденные, (до выпойки молозива)				
ПЦР– (n=27)	51,3±7,1	7,05±0,8	42,8±2,5	13,8±0,9
ПЦР+ (n=5)	70,8±5,3*	5,85±0,5*	34,5±3,1*	9,65±1,4*
телята в возрасте 1 месяц				
ПЦР– (n=9)	71,1±4,3	8,3±0,4	41,1±1,8	14,4±2,3
ПЦР+(n=6)	79,6±3,7	6,2±1,0*	34,7±2,2*	10,3±1,2
телята в возрасте 3 месяца				
ПЦР–(n=7)	89,4±3,1	7,2±2,5	43,6±1,9	13,8±2,2
ПЦР+(n=7)	101,6±4,9*	6,7±1,9	38,3±1,4*	11,2±1,7

* $p \leq 0,05$ – разница достоверна в сравнении с данными ПЦР-позитивных телят

зу тех исследований, которые доказывают неспособность материнских «противолейкозных» антител защищать потомство от инфицирования ВЛ;

– выпойка не инфицированным телятам сборного молока, от неблагополучного по лейкозу стада, а так же совместное содержание восприимчивых и инфицированных ВЛ животных способствует появлению и увеличению титра антител к ВЛ, а соответственно положительные реакции в РИД и ИФА, однако при этом молозиво и молоко не является ведущим фактором в передаче инфекции;

– у внутриутробно инфицированных телят от рождения до 3-х месячного возраста выявлены иммунодепрессивные изменения, так на фоне иммунологической напряженности, на что указывает повышение уровня циркулирующих иммунных комплексов, установлен дефицит клеточного и гуморального звеньев иммунитета;

Таким образом, для проведения эффективных противолейкозных мероприятий необходимо уделять внимание основным позициям:

– ранняя диагностика инфицированности молодняка в ПЦР;

– раздельное содержание восприимчивых и инфицированных животных;

– соблюдение принципов асептики при взятии крови, фиксации, вакцинации, осеменении и других ветеринарных мероприятиях;

– для снижения риска инфицирования молодняка необходимо проведение мероприятий направленных на нормализацию иммунологического статуса животных.

РЕЗЮМЕ

В статье представлены данные по прижизненной диагностики и формировании иммунного статуса у телят, инфицированных вирусом лейкоза. Авторами сделаны несколько выводов: диагностику инфицированности вирусом лейкоза у глубокостельных коров необходимо производить с применением ПЦР, так как серологические методы в 58% случаев субъективны; в стационарно неблагополучном по лейкозу хозяйстве процент вертикальной передачи вируса лейкоза может увеличиться до 15% и более; молозиво и молоко от инфицированных ВЛ матерей не является ведущим фактором в передаче инфекции; у внутриутробно инфицированных телят от рождения до 3-х месячного возраста выявлены иммунодепрессивные изменения.

SUMMARY

In article the data on lifetime diagnostics and formation of the immune status at infected by a leukemia virus of cattle are submitted. Authors make some conclusions: diagnostics of infection by a leukemia virus at for a long time pregnant cows is necessary for making with application polymer chain reaction as methods of research of whey of blood in 58% of cases are subjective; in permanently unsuccessful on leukemia a facilities the interest of vertical transfer of a leukemia virus can increase up to 15% and more; the first milk and milk from infected BLV mothers is not conducting factor in transfer of an infection; at through a placenta infected cattle during pregnancy from birth up to 3 monthly age are revealed immune deficiency of change.

Литература

1. Бурба Л.Г. Диагностика лейкозов сельскохозяйственных животных / Л.Г. Бурба, А.А. Кунаков – М.: колос, 1983. – С. 31-103.
2. Ветеринарная гематология./ Г.А. Симонян, Ф.Ф. Хисамутдинов // М: Колос, 1995.- 256 с.
3. Гулюкин М.И. Обзор эпизоотической ситуации по лейкозу в РФ/ М.И. Гулюкин// Доклад на координационном совещании ВИЭВ. – Москва, 2005.-17с.
4. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология/ Г.Н.Дранник. – М.: МИА, 2003. – 603 с.
5. Иммунологические методы/Под ред. Г. Фримеля. – М.: Медицина,1987.– 472с.
6. Калашникова Л.А. ДНК-технологии оценки сельскохозяйственных животных /Л.А. Калашникова, И.М. Дунин, В.И. Глазко, Н.В. Рыжова, Е.П. Голубкина. – Лесные поляны, 1999.- 148 с.
7. Ковалюк Н.В. Использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) для ранней диагностики лейкоза крупного рогатого скота / Н.В. Ковалюк, Е.В. Мачульская, А.Е. Волченко // Научные основы повышения продуктивности с/х животных: Сб. науч. трудов. – Ч.1. – Краснодар, 2008. – С. 21-24.
8. Логинов С.И. Иммунные комплексы при лейкозе крупного рогатого скота /С.И. Логинов// Журнал «Ветеринарная патология».-2003. № 1.- с. 85-87.
9. Пономаренко Д.Г. Лейкоз в структуре основных инфекционных патологий крупного рогатого скота Российской Федерации, современная эпизоотическая ситуация по лейкозу КРС в Ставропольском крае/ Д.Г. Пономаренко, С.С. Абакин, Е.А. Борщев// Сб. научн. ст. по мат. 72-й научн.-практ. конф. СтГАУ – Ставрополь, 2008, С.109-111.
10. Пономаренко Д.Г. Патоморфологическое проявление иммунодефицита у крупного рогатого скота при лейкозе/ Д.Г. Пономаренко, С.С. Абакин, Т.И. Лапина// Журнал «Ветеринарный врач» 2009, №1, стр. 19-22
11. Проблемы лейкоза животных: под ред. П.Н. Смирнов. – ИПП «Советская Сибирь»-Новосибирск, - 1992.- 478с.
12. Противоэпизоотические мероприятия при лейкозе крупного рогатого скота в фермерских и личных подсобных хозяйствах граждан: Рекомендации/ М.И. Гулюкин и др. – Москва, 2007.- 14с.
13. Сюрин В.Н. Диагностика вирусных болезней животных: Справочник / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина. – М.: Агропромиздат, 1991. – С. 274-291.
14. Тихонов В.Л. Состояние сывороточных иммуноглобулинов при лейкозе крупного рогатого скота (Иркутской области)/В.Л. Тихонов// Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2005. - № 2. С. 102–109.
15. Федоров Ю.Н. Иммунодефициты крупного рогатого скота/ Ю.н.Федоров// Ветеринария.- 2006.-№1.-с.3-5.